

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-043359

(43)Date of publication of application : 14.02.1995

(51)Int.Cl.

G01N 31/22
G01N 33/62

(21)Application number : 05-183594

(71)Applicant : FUJI PHOTO FILM CO LTD

(22)Date of filing : 26.07.1993

(72)Inventor : ARAI TAKAYOSHI

(54) INTEGRATED MULTILAYER ANALYTIC ELEMENT FOR AMMONIA OR SUBSTRATE PRODUCING AMMONIA

(57)Abstract:

PURPOSE: To allow accurate measurement of substrate in a sample with no influence of the pH of a liquid to be inspected by using gelatin as the binder for indicator layer.

CONSTITUTION: A transparent polymer support is employed for multilayer analytic element and an indicator layer is provided thereon. The indicator layer contains such compound as reacting on gas-like ammonia to cause variation in the absorption wavelength. Such compound includes leuco dye, pH indicator, etc., and at least one kind thereof is mixed with gelatin and the mixture is applied onto the transparent support thus forming an indicator layer. An alkaline treated gelatin or a gelatin subjected to deionization after alkaline treatment is preferably employed. A liquid shield layer of microporous substance, a sample, etc., are bonded on the indicator layer. When gelatin is employed in the indicator layer, fluctuation in the quantity of urea nitrogen due to the pH of sample is suppressed, resulting in the accurate measurement of substrate in the sample.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 25.02.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3175413

[Date of registration] 06.04.2001

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-43359

(43) 公開日 平成7年(1995)2月14日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 31/22	1 2 1 G			
33/62		Z 7055-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平5-183594

(22) 出願日 平成5年(1993)7月26日

(71) 出願人 000005201

富士写真フイルム株式会社

神奈川県南足柄市中沼210番地

(72) 発明者 新井 貴喜

埼玉県朝霞市泉水三丁目11番46号 富士写

真フイルム株式会社内

(74) 代理人 弁理士 田中 政浩 (外1名)

(54) 【発明の名称】 アンモニア又はアンモニア生成基質分析用一体型多層分析素子

(57) 【要約】

【目的】液体遮断層の接着が良好であり、被検液のpHの影響を排除して検体の広い濃度範囲において高感度かつ高精度で分析しうるアンモニア又はアンモニア生成基質分析用一体型多層分析要素を提供する。

【構成】透明支持体の上に、ガス状アンモニアを検出する指示薬層、使用条件下に液体試料を実質的に遮断しかつガス状アンモニアを透過させる液体遮断層、アルカリ性緩衝剤を含有し必要により基質と反応してアンモニアを生成することのできる試薬を有する試薬層、及び展開層がこの順に一体に接着積層された、液体試料中のアンモニア又はアンモニア生成基質分析用一体型多層分析素子において、液体遮断層が微多孔性層でありかつ指示薬層のバインダーがゼラチンであることを特徴とする液体試料中のアンモニア又はアンモニア生成基質分析用一体型多層分析素子。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 透明支持体の上に、ガス状アンモニアを検出する指示薬層、使用条件下に液体試料を実質的に遮断しかつガス状アンモニアを透過させる液体遮断層、アルカリ性緩衝剤を含有し必要により基質と反応してアンモニアを生成することのできる試薬を有する試薬層、及び展開層がこの順に一体に接着積層された、液体試料中のアンモニア又はアンモニア生成基質分析用一体型多層分析素子において、液体遮断層が微多孔性層でありかつ指示薬層のバインダーがゼラチンであることを特徴とする液体試料中のアンモニア又はアンモニア生成基質分析用一体型多層分析素子

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、液体試料中のアンモニア又はアンモニア生成基質を分析するための一体型多層分析素子に関するものである。更に詳細には、本発明は血液、尿等の体液中の尿素窒素の分析に有用な分析素子に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 従来、体液中の尿素窒素の測定法として、測定の簡易化、迅速化をはかり測定者の個人差をなくすために乾式法（ドライケミストリ）と呼ばれる方法が種々提案されている。その典型的なものは、ウレアーゼとアルカリ性緩衝剤を含有する試薬層と、ガス状アンモニアを検出する指示薬層とを備え、両者の間にガス状アンモニアのみを選択的に透過させるような選択透過層をはさんで一体化した一体型多層分析素子（一体型多層分析要素、一体型多層分析材料、一体型多層分析フィルムとも称される）を使用するものである。たとえば特開昭52-3488号には、基本的上記多層構造を有する一体型分析素子が開示されている。この分析素子ではアンモニアガスの選択透過層として疎水性ポリマー薄膜が使用されているが、指示薬層として親水性バインダーを用いた場合、指示薬層と疎水性ポリマー選択透過層との接着が難しく、一体型多層分析素子として製造する際の問題点となる。

【0003】 一方、特開昭58-77661号には、透明支持体上に、ガス状アンモニア用の指示薬層、液体遮断層、アルカリ性緩衝剤を含有し必要により基質と反応してアンモニアを生成することの出来る試薬を有する試薬層、および展開層がこの順に一体に接着積層された、液体試料中のアンモニア又はアンモニア生成基質分析用一体型多層分析材料において、液体遮断層が、多孔性物質より成り、使用条件下に液体試料を実質的に遮断しかつガス状アンモニアを透過させる空気孔を構成する事を特徴とする液体試料中のアンモニア又はアンモニア生成基質分析用一体型多層分析材料が開示されている。指示薬層はセルロースエステル類、アルキルセルロース類、ポリアクリレート等をバインダーに用いて形成されている。こ

の多層分析材料においては、選択透過層としてメンブレンフィルターを使用して、指示薬層との接着性を改善し、かつ高感度化をはかった一体型多層分析素子が開示されている。しかし、これらの乾式法一体型分析素子を用いて体液中のアンモニア又はアンモニア生成基質を測定する場合、試料の希釈を行わないため溶液法に比べて被検液のpHの影響を受けやすいという欠点がある。特に尿素窒素を測定する場合は、ウレアーゼによって生成するアンモニア量が多いため、低濃度から高濃度にわたる広い定量域を確保するために試薬層のpHをアンモニウムイオンのpKaより低いところに設定する必要がある、被検液のpHの影響をより受けやすいのみならず、試薬層のpHのわずかな違いで感度に変化するため、製造する際の問題点ともなっていた。

【0004】 そのほか、特開平4-157363号公報には、支持体の下塗層にアンモニア及びアンモニウムイオンを実質的に含まないポリビニルアルキルエーテル等を用い、あるいは指示薬層のバインダーにポリビニルアルキルエーテルを用いて、発色光学濃度がより高く、バックグラウンドの発色光学濃度が低く、測定精度のより高いアンモニアまたはアンモニア生成物質分析用一体型多層分析要素を得ている。また、特開平4-157364号公報には、多孔性展開層にポリ（N-ビニルピロリドン）を含有させ、アンモニア生成反応試薬層にアンモニアを実質的に含まずかつpH約9.0以上でアンモニアを発生せずバインダー性能も変化しないバインダーを用いて、発色光学濃度がより高く、バックグラウンドの発色光学濃度が低く、測定精度のより高いアンモニアまたはアンモニア生成物質分析用一体型多層分析要素を得ている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、上記課題を解決して、液体遮断層の接着が良好であり、被検液のpHの影響を排除して検体の広い濃度範囲において高感度かつ高精度で分析しうるアンモニア又はアンモニア生成基質分析用一体型多層分析要素を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明は上記目的を達成したアンモニア又はアンモニア生成基質分析用一体型多層分析素子を提供するものであり、透明支持体の上に、ガス状アンモニアを検出する指示薬層、使用条件下に液体試料を実質的に遮断しかつガス状アンモニアを透過させる液体遮断層、アルカリ性緩衝剤を含有し必要により基質と反応してアンモニアを生成することのできる試薬を有する試薬層、及び展開層がこの順に一体に接着積層された、液体試料中のアンモニア又はアンモニア生成基質分析用一体型多層分析素子において、液体遮断層が微多孔性層でありかつ指示薬層のバインダーがゼラチンであることを特徴としている。この分析素子の特徴は、従来の指示薬層のバインダーである疎水性ポリマーに代え

3

て、ゼラチンを指示薬層バインダーとして用いたことである。

【0007】本発明の多層分析素子は、アンモニア自体あるいはアンモニア生成基質と試薬との反応により生成するアンモニアを測定することにより該アンモニア生成基質を間接的に測定するのに有利に使用される。本明細書において「アンモニア生成基質」とは、特定の試薬と反応してそれ自体からアンモニアを生成するか、あるいは複数の反応系を経由してアンモニアを生成するような化合物又は化合物群を意味する。

【0008】本発明分析素子の支持体としては、このような分析素子において一般的に用いられているような疎水性の透明支持体、たとえばポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、ポリビニル化合物のようなポリマーから成る透明支持体が使用される。

【0009】支持体上に指示薬層が設けられる。指示薬層には、ガス状アンモニアと反応して吸収波長に変化を生じるような化合物（以下、発色前駆体という）が含まれている。本発明分析素子に使用可能な発色前駆体としては、たとえば、ロイコシアニン染料、ニトロ置換ロイコ染料及びロイコフタレイン染料のようなロイコ染料（特開昭52-3488号、米国特許 RE 30 267号に記載）；ブロムフェノールブルー、ブロムクレゾールグリーン、ブロムチモールブルー、キノリンブルー及びロゾール酸のようなpH指示薬（共立出版、化学大辞典、10巻63～65頁に記載）；トリアリールメタン系染料前駆体；ロイコベンジリデン色素（特開昭56-145273号に記載）；ジアゾニウム塩とアゾ染料カブラー；塩基漂白可能染料等が挙げられる。

【0010】これらの発色前駆体の少なくとも1種を、ゼラチンと混合し、透明支持体上に塗布して指示薬層を形成する。ゼラチンは一般的に、その原料の違いで骨ゼラチンと皮ゼラチンの2種がある。また、それぞれについて製造過程の処理法の違いで、アルカリ処理ゼラチンと酸処理ゼラチンに大別できる。これらゼラチンはそのまま、又は脱イオン処理、又はpH調製等のさまざまな処理の後に用いられる。前記のゼラチンはいずれをも用いることができる。特に好ましいゼラチンはアルカリ処理ゼラチン、アルカリ処理の後に脱イオン処理したゼラチンである。

【0011】ゼラチンは水又は水-水溶性有機溶剤に一樣に溶解した溶液の形態で塗布される。

【0012】ゼラチンの重量に対して、発色前駆体の使用量は0.1～50重量%程度、好ましくは0.5重量%～20重量%程度が適当である。また、感度を調製する目的で各種緩衝剤、有機酸、無機酸等を加えてpHを調製することができる。緩衝剤は後述するもののなかから選択することができ、有機酸、無機酸としては、エタンスルホン酸、アスパラギン酸、アゼライン酸、グルタル酸、コハク酸、グルタコン酸、酒石酸、ピメリン酸、マロン酸、

4

リンゴ酸、3,3-ジメチルグルタル酸、クエン酸、P-トリエンズルホン酸、過塩素酸、塩酸等を使用できる。さらに、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム等のアルカリ等を指示薬層に加えることもできる。塗布液を形成するのに用いる溶媒は、水あるいは水とアセトン、2-メトキシエタノール、メチルエチルケトン、メタノール、エタノール等の水溶性有機溶剤の混合溶媒が適当であり、これらの溶剤に発色前駆体、ゼラチン等を固形分濃度が1～30重量%程度、好ましくは3～20重量%程度となるように加えて塗布液とする。これを乾燥膜厚1～30μm程度、好ましくは3～20μmとなるように透明支持体上に塗布、乾燥して指示薬層を形成する。

【0013】指示薬層の上に液体遮断層を設ける。本発明の多層分析素子の液体遮断層は、多層分析素子の製造時及び／又は分析操作時において、塗布液、試料液等の液体及びこれらの液体に溶解含有されている妨害成分（例えば、アルカリ性成分等）が実質的に透過せずかつガス状アンモニアが透過できるような貫通空気孔を有する微多孔性物質で構成されている。この微多孔性物質は、液体、特に水による毛細管現象が実質的に生じないような疎水性材料あるいは、毛細管現象が実質的に生じない程度に疎水化処理（撥水性処理）された材料で作られているのが好ましい。

【0014】微多孔性材料の撥水化処理は、シリコーン樹脂、シリコーンオイル、弗素樹脂、弗素オイルに代表される、一般に疎水化処理剤又は撥水化処理剤として公知の材料をそのまま、あるいは必要により溶剤（例えば、ヘキサン、シクロヘキサン、石油エーテル等）で固形分含有量が約0.1～約5重量%の範囲内になるように希釈し、これを含浸、塗布又はスプレー等の方法により、連続した空隙を有する微多孔性材料の少なくとも一表面及びその近傍に適用することにより実施することができる。

【0015】微多孔性物質の例としては、メンブランフィルター；繊維状材料が相互にからみあわされてなるか、あるいは接着又は結合されてなる微多孔性材料（例えば、紙、濾紙、フェルト、不織布等）；及び織物生地、編物生地又は細網状物からなる微多孔性材料を挙げることができる。

【0016】例えばセルロースアセテート、セルロースニトレート、再生セルロース、ポリアミド、ビスフェノールAのポリカーボネート、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリテトラフルオロエチレン等のフッ素含有ポリマー等を用いて作られているメンブランフィルターあるいはこれらの材料を必要により撥水性処理したものが挙げられる。本発明の一体型多層要素に用いる場合、上記メンブランフィルターの厚さは、約30μm～約300μmの範囲内、好ましくは約70μm～約200μmの範囲内である。メンブランフィルターの気孔率（空隙率）は、約

25%～約90%、好ましくは約60～約90%である。また、メンブランフィルターの平均孔径は約0.01～約20 μ m、好ましくは約0.1～約10 μ mの範囲内である。これらメンブランフィルターは、既に多くのメーカーから様々な種類のものが市販されており、これらの市販品の中から必要に応じて選択して用いることができる。

【0017】これら微多孔性材料は前述した指示薬層に実用的な強度をもって接着する。接着は、指示薬層表面をウェット状態にして貼り付け乾燥すればよい。ここにウェット状態とは、バインダーを溶解している溶媒が残っているか、あるいは乾燥した膜が可溶性溶媒で濡らされてバインダーが膨潤状態、分散状態又は溶液状態にあることを意味する。

【0018】液体遮断層の上に、試薬層を設ける。試薬層は、アンモニア生成基質と反応してアンモニアを生成させる試薬（一般には酵素又は酵素を含有する試薬）、反応により生成したアンモニアをガス状アンモニアとして効率よく遊離させるためのアルカリ性緩衝剤及びフィルム形成能を有する親水性ポリマーバインダーを通常含有する層である。このアンモニア生成基質と試薬との組み合わせとしては、たとえば、尿素/ウレアーゼ、クレアチニン/クレアチニンデヒミナーゼ、アミノ酸/アミノ酸デヒドロゲナーゼ、アミノ酸/アミノ酸-オキシダーゼ、アミノ酸/アミノ酸-デヒドラターゼ、アミノ酸/アンモニア-リアーゼ、アミン/アミン-オキシダーゼ、ジアミン/アミン-オキシダーゼ、グルコース及び燐アミダート/燐アミダートヘキソース燐トランスフェラーゼ、ADP/カルバミン酸塩キナーゼ及び燐酸カルバモル、酸アミド/アミドヒドロラーゼ、ヌクレオ塩基/デアミナーゼ、ヌクレオシド/デアミナーゼ、ヌクレオチド/デアミナーゼ、グアニン/グアナーゼ等が挙げられる。

【0019】試薬層に用いることができるアルカリ性緩衝剤としては、pH7.0から10.5、好ましくは7.5から10.0の範囲の緩衝剤を用いることができる。緩衝剤の具体例としては、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（Tris）、燐酸塩緩衝剤、N,N-ビス（2-ヒドロキシエチル）グリシン（Bicine）、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-ヒドロキシプロパン-3-スルホン酸（HEPPSO）、N-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-エタンスルホン酸（HEPES）等のGoodの緩衝剤、燐酸塩緩衝剤等を挙げることができる。

【0020】試薬層に用いることができるフィルム形成能を有する親水性ポリマーバインダーとしては、ゼラチン、アガロース、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース等を挙げることができる。

【0021】試薬層には、アンモニア生成物質と反応してアンモニアを生成させる試薬、反応により生成したア

ンモニアをガス状アンモニアとして効率よく遊離させるためのアルカリ性緩衝剤及びフィルム形成能を有する親水性ポリマーバインダー以外にも必要に応じて、湿潤剤、バインダー架橋剤（硬化剤）、安定剤、重金属イオントラップ剤（錯化剤）等を含有させることができる。

【0022】試薬層は、アンモニア生成基質と反応してアンモニアを生成させる試薬、アルカリ性緩衝剤及び必要に応じて加えられる上記試薬類を、フィルム形成能を有するゼラチン等の親水性ポリマーバインダーと混合して塗布液とし、液体遮断層の上に塗布、乾燥することにより形成することができる。

【0023】試薬層に含まれるアンモニア生成基質と反応してアンモニアを生成させる試薬の量は、バインダーの重量に対して通常約0.1～約50重量%、好ましくは約2～約20%の範囲内である。アルカリ性緩衝剤の量はバインダーの重量に対して約0.1～約60重量%の範囲内であるのが適当である。この試薬層の乾燥膜厚は通常約1～約40 μ m、好ましくは約3～約20 μ mの範囲内である。

【0024】試薬層の上に展開層が設けられる。展開層としては、特開昭55-164356（対応米国特許 4 292 272）、特開昭57-66359（対応米国特許 4 783 315）等に記載の織物布地展開層（例、ブロード、ポプリン等の平編物布地）、特開昭60-222769（対応EP特許 0 162 302 A）等に記載の編物布地展開層（例、トリコット編物布地、ダブルトリコット編物布地、ミラニーズ編物布地）、特開昭57-148250に記載の有機ポリマー繊維バルブ含有抄造紙展開層、特開昭57-125847等に記載の繊維と親水性ポリマーの分散液を塗布して形成した展開層等の繊維質微多孔性展開層；特公昭53-21677（対応米国特許 3 992 158）等に記載のメンブランフィルター層（ブラッシュポリマー層）、ポリマーマイクロビーズ等の微粒子が親水性ポリマーバインダーで点接触状に接着されてなる連続微空隙含有等方的微多孔性展開層、特開昭55-90859（対応米国特許 4 258 001）等に記載のポリマーマイクロビーズが水で膨潤しないポリマー接着剤で点接触状に接着されてなる連続微空隙含有等方的微多孔性層（三次元格子状粒状構造物層）展開層等の非繊維等方的微多孔性展開層；特開昭61-4959（対応米国特許 5 019 347）、特開昭62-138756、特開昭62-138757、特開昭62-138758（対応EP特許 0 226 465 A）等に記載の複数の微多孔性層（例、織物布地又は編物布地とメンブランフィルターの2層、織物布地又は編物布地とメンブランフィルターと織物布地又は編物布地の3層）をそれらの表面で微細な不連続点状又は島状（印刷分野における網点状）の接着剤で積層接着した血球分離能力の優れた展開層がある。

【0025】展開層に用いられる織物生地又は編物生地は特開昭57-66359に記載のグロー放電処理又はコロナ放電処理に代表される物理的活性化処理を布生地 of 少な

くとも片面に施すか、又は特開昭55-164356、特開昭57-66359等に記載の水洗脱脂処理、親水性ポリマー含浸等親水化処理、又はこれらの処理工程を適宜に組み合わせて逐次実施することにより布生地を親水化し、下側（支持体に近い側）の層との接着力を増大させることができる。また、特開昭59-171864、特開昭60-222769、特開昭60-222770等に記載のように、展開層の上からポリマー含有水溶液又はポリマー含有水-有機溶媒混合溶液を塗布して液体試料の展開面積又は広がりを制御することができる。

【0026】試薬層と展開層との間に色遮蔽層又は光反射層を設けることができる。色遮蔽層又は光反射層は光遮蔽性又は光遮蔽性と光反射性を兼ね備えた二酸化チタン微粒子、硫酸バリウム微粒子等の白色微粒子がゼラチン等の親水性ポリマーバインダー中にほぼ一様に分散されている乾燥時の厚さ約2 μ mから約20 μ mの範囲の層である。

【0027】さらに試薬層、色遮蔽層又は光反射層の上には展開層を強固に接着一体化する目的で親水性ポリマーからなる公知の接着層を設けることができる。接着層の乾燥時の厚さは約0.5 μ mから約5 μ mの範囲である。

【0028】試薬層、色遮蔽層又は光反射層、接着層、展開層等には界面活性剤を含有させることができる。その例としてノニオン性界面活性剤がある。ノニオン性界面活性剤の具体例として、p-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール、p-ノニルフェノキシポリエトキシエタノール、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、p-ノニルフェノキシポリグリシドール、オクチルグルコシド等がある。ノニオン性界面活性剤を展開層に含有させることにより水性液体試料の展開作用（メタリング作用）がより良好になる。ノニオン性界面活性剤を試薬

試薬層の被覆量（1 m^2 当たり）

アルカリ処理ゼラチン	22.7g
p-ノニルフェノキシポリグリシドール	420mg
ウレアーゼ	35.9KU
エチレンジアミン四酢酸・四ナトリウム塩	245mg
N-2-ヒドロキシエチルピペラジニン-N'-2-ヒドロキシプロパン-3-スルホン酸（HEPPSO）	7.0g
（塗布液のpH8）	

【0032】さらにこの積層物に、展開性を改良する目的で下記の被覆量となるよう、含浸塗布、乾燥して尿素窒素定量分析用一体型多層分析素子を調製した。

ポリビニルピロリドン	6.3g
p-ノニルフェノキシポリグリシドール	80mg

指示薬層の被覆量（1 m^2 当たり）

プロモクレゾールグリーン	360mg
ポリ酢酸ビニル・アクリル酸エステル共重合体ラテックス	14.6g
N-ポリオキシエチレン-N-オクタスルホンアミド	100mg

*層、色遮蔽層又は光反射層、接着層などに含有させることにより分析操作時に水性液体試料中の水が試薬層に実質的に一様に吸収されやすくなり、また展開層との液体接触が迅速にかつ実質的に一様になる。

【0029】本発明の一体型多層分析素子を用いて液体試料中のアンモニア又はアンモニア生成基質を測定するには、展開層の上に3~30 μ L、好ましくは6~15 μ Lの範囲の全血、血漿、血清、尿等の水性液体試料滴を点着し、1~10分の範囲で、約20~40 $^{\circ}$ Cの範囲の実質的に一定の温度でインキュベーションを行った後、透明支持体側から指示薬層の色変化（発色又は退色）の程度を反射測光するか、標準色と視覚的に比較すればよい。

【0030】

【実施例】

実施例1

透明ポリエチレンテレフタレート（PET）フィルム（厚さ180 μ m）の上に下記の被覆量となるように指示薬層を塗布、乾燥後、指示薬層表面を30g/ m^2 のp-ノニルフェノキシポリグリシドール（グリシドールサーファクタント10G）水溶液で膨潤させた後、ポリエチレン製メンブランフィルター（平均孔径0.15 μ m、空隙率70%、厚さ100 μ m）を一様に圧着して液体遮断層を設けた。

指示薬層の被覆量（1 m^2 当たり）

プロモクレゾールグリーン	158mg
アルカリ処理ゼラチン	15.8g
p-ノニルフェノキシポリグリシドール	130mg
（塗布液のpH3）	

【0031】次いで液体遮断層の上に、試薬層を下記の被覆量となるように塗布、乾燥後、試薬層表面を30g/ m^2 のp-ノニルフェノキシポリグリシドール水溶液で膨潤させた後、編布（ゲージ数40）を一様に圧着した。

【0033】比較例1

指示薬層を下記のように変更した以外は実施例1と同様にして、尿素窒素定量分析用一体型多層分析素子を調製した。

(塗布液の pH 3)

【0034】試料 pH の尿素窒素定量への影響評価
前記 2 種の尿素窒素定量分析用一体型多層分析素子を下記の方法で性能を評価した。

【0035】7%人血清アルブミン水溶液に、尿素を窒素量で 10、50mg/dL となるように溶解した。次いで、各分析素子の展開層にこの液を 10 μ L ずつ点着し、6 分後の発色光学濃度を中心波長 625nm の可視光を用いて反射測光し、検量線を作成した(表 1)。

【0036】次に、7%人血清アルブミン水溶液に尿素を窒素量で 12mg/dL となるように溶解した後、pH が 6.0、6.6、7.2、7.8、8.4、9.0 になるように調整して、評価試験液を調製した。次いで検量線作成時と同じ方法で点着後、反射測光して、各々の検量線を用いて、尿素窒素量を算出した(表 2)。

【0037】指示薬層にゼラチンを用いない比較例 1 に対して、ゼラチンを用いた実施例 2 の方が、試料の pH による尿素窒素量のバラツキが小さいことが、表 2 より明らかである。

【0038】

【表 1】

尿素窒素濃度	反射光学濃度	
	実施例 1	比較例 1
10mg/dL	0.406	0.413
50mg/dL	0.740	1.193

【0039】

【表 2】

試料 pH	尿素窒素量 (mg/dL)	
	実施例 1	比較例 1
6.0	11.9	11.7
6.6	12.0	11.8
7.2	12.4	12.2
7.8	12.2	12.5
8.4	12.1	12.7
9.0	12.3	12.9

【0040】試料中の EDTA の尿素窒素定量への影響評価

7%人血清アルブミン水溶液に尿素を窒素量で 12mg/dL となるように溶解した後、EDTA-2Na を 1.5、5.0、10.0mg/mL となるように添加して、評価試験液を調製した。次いで検量線作成時と同じ方法で点着後、反射測光して、各々の検量線を用いて、尿素窒素量を算出した(表 3)。

10 【0041】指示薬層にゼラチンを用いない比較例 1 に対して、ゼラチンを用いた実施例 2 の方が、試料中の EDTA-2Na 量による尿素窒素量のバラツキが小さいことが、表 3 より明らかである。

【0042】

【表 3】

EDTA-2Na (mg/mL)	尿素窒素量 (mg/dL)	
	実施例 1	比較例 1
0	12.0	12.0
1.5	11.8	11.5
5.0	11.6	10.9
10.0	11.3	10.0

20

【0043】

【発明の効果】本発明の一体型多層分析素子は、指示薬層のバインダーにゼラチンを用いることで、被検液の pH の影響を受けずに正確に試料中の基質を測定することが可能になった。また、試薬層の微妙な pH 変動に対しても感度が安定し、製造安定性が増大した。一方、液体遮断層に微多孔性物質を用いることで、液体遮断層と指示薬層及び試薬層との接着強度が増し、物理的強度に優れた一体型多層分析素子を作製することが可能になった。さらに、指示薬層のバインダーにゼラチンを用いることで、被検液が血液である場合に抗凝固剤としてふくまれる EDTA-2Na 又は EDTA-2K による血中尿素窒素測定への影響を軽減することができた。

30